

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043912**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.07.05

(51) Int. Cl. *C12N 15/90* (2006.01)
C12N 13/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
201990758

(22) Дата подачи заявки
2017.11.13

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЭЛЕКТРОКОМПЕТЕНТНЫХ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК И СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ УКАЗАННЫХ КЛЕТОК**

(31) **10 2016 121 899.5**

(56) WO-A2-2009114093
WO-A1-2016102508

(32) **2016.11.15**

(33) **DE**

(43) **2019.10.31**

(86) **PCT/EP2017/079011**

(87) **WO 2018/091396 2018.05.24**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ИММАТИКС БАЙОТЕКНОЛОДЖИЗ
ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:
**Бунк Себастьян, Маурер Доминик,
Унвердорбен Феликс (DE)**

(74) Представитель:
Угрюмов В.М. (RU)

(57) Изобретение относится к улучшенной дрожжевой трансформации дрожжевых клеток и библиотекам дрожжевых клеток, трансформированных таким способом. Более конкретно, изобретение относится к трансформации дрожжей с помощью электропорации.

B1

043912

**043912
B1**

Изобретение относится к улучшенной дрожжевой трансформации дрожжевых клеток и библиотекам дрожжевых клеток, трансформированных таким способом. Более конкретно, настоящее изобретение относится к трансформации дрожжей с помощью электропорации.

Уровень техники

На протяжении многих лет краеугольными камнями в лечении рака были хирургия, химиотерапия и радиотерапия. В течение последнего десятилетия для ряда раковых заболеваний в качестве стандартной терапии появились средства таргетной терапии, такие как иматиниб (Gleevec®) и трастузумаб (Herceptin®) - лекарственные препараты, направленные на раковые клетки за счет нацеливания на специфические молекулярные изменения, наблюдавшиеся главным образом в этих клетках.

Сейчас много ожиданий возлагается на иммунотерапию - вид терапии, использующий потенциал иммунной системы пациентов для борьбы с их заболеванием. Один из подходов к иммунотерапии включает конструирование клеток собственной иммунной системы пациентов, чтобы они распознавали и атаковали их опухоли. Этот подход, называемый адаптивным переносом клеток (АПК), привел к ряду заметных клинических ответов у пациентов с раком на поздних стадиях.

Тогда как обычно ожидается, что естественные Т-клеточные рецепторы (ТКР) обладают достаточной аффинностью для достижения эффективности лечения, во время разработки терапевтических ТКР или их производных, таких как, например, растворимые ТКР (pТКР), обычно желательно/необходимо так называемое "созревание аффинности", чтобы вызывать эффективный иммунный ответ *in vivo*.

Для созревания обычно используется способ с применением поверхностного дисплея на основе дрожжей. Тем не менее, для создания библиотек, которые обладают достаточным разнообразием необходимым высокоэффективный способ трансформации дрожжей.

На протяжении долгого времени существовало желание идентифицировать ТКР, состоящих по существу из природных последовательностей альфа- и бета-цепи, которые специфически связываются с конкретными антигенами, такие как, например, ТКР или их растворимые аналоги, могут быть разработаны для создания основы для потенциальных терапевтических подходов. Антигены, распознаваемые идентифицированными ТКР могут ассоциироваться с заболеванием, таким как рак, вирусные инфекции, аутоиммунные заболевания, паразитарные инфекции и бактериальные инфекции. Следовательно, такие средства терапии могут использоваться для лечения указанных заболеваний.

Более того, после идентификации естественных или нативных ТКР и определения их последовательностей можно ввести мутации, которые приведут к увеличению аффинности или времени полужизни, при необходимости, как это описано в заявке WO 2012/013913. Традиционно попытки идентификации ТКР, которые специфически связываются с ассоциированным с заболеванием антигеном, таким как раковые вирусные, аутоиммунные или бактериальные антигены, ограничивались использованием образцов крови, взятых у доноров-добровольцев. Такие образцы используются для выделения Т-клеток и их соответствующих ТКР, которые связываются с ассоциированными с заболеваниями антигенами. Для этого подхода, как правило, требуется не менее 20 доноров. Процесс длительный и трудоемкий, и не существует гарантии, что будут идентифицированы Т-клеточные рецепторы, связывающиеся с антигеном. В случае идентификации функциональных Т-клеточных рецепторов они зачастую имеют слабую аффинность к антигену, низкую специфичность и/или не сворачиваются надлежащим образом *in vitro*. Разнообразие Т-клеток, которые поддаются скринингу, ограничено разнообразием Т-клеток среди доноров. Некоторые ассоциированные с заболеванием антигены, включая большинство раковых антигенов, являются аутоантигенами; поскольку отбор в вилочковой железе служит для устранения ТКР, распознающих аутоантигены, то ТКР, специфичные к ассоциированным с заболеванием антигенам, могут не присутствовать в естественном репертуаре доноров, или же могут иметь слабую аффинность к антигену.

Попытки создания библиотеки для выделения новых ТКР со специфичностью связывания с антигенами продолжаются в течение нескольких лет. Создать ТКР-библиотеки намного сложнее, чем сравнимые библиотеки антител, поскольку цепи ТКР менее стабильны и часто не презентуются корректно. Трудности, связанные с созданием библиотеки ТКР, чрезвычайно велики. Предпочтительно обеспечить сохранение вариаций в длине CDR3, (как было обнаружено в природном репертуаре). Существенная часть любой библиотеки обычно оказывается непригодной для использования вследствие стоп-кодонов, сдвига рамок считывания, проблем с фолдингом и комбинаций ТКР-цепей, которые, возможно, просто не будут связываться с комплексом HLA. Принимая во внимание большое количество генов переменных участков альфа- и бета-цепей, а также генов J- и D-сегментов, шансов для получения и идентификации функционально активной свертывающейся альфа-цепи и функционально активной свертывающейся бета-цепи, которые совместно образуют ТКР, связывающийся с антигенным пептидом с требуемой специфичностью, крайне мало.

Доступность средств для создания библиотек нуклеиновых кислот и рекомбинантных продуктов, полученных с их помощью, таких как фармацевтически применимые белки, в эукариотических системах, таких как дрожжи, обеспечивает существенными преимуществами по сравнению с использованием прокариотических систем, таких как *E. coli*. Как правило, дрожжи можно выращивать с более высокой плотностью клеток, чем бактерии, и они легко адаптируются к непрерывному процессу ферментации.

Тем не менее, разработка видов дрожжей в качестве систем хозяев/векторов для получения рекомбинантных продуктов и библиотек связана с серьезными затруднениями вследствие отсутствия знаний об условиях трансформации и подходящих средств для стабильного введения чужеродных нуклеиновых кислот в дрожжевую клетку-хозяина.

Среди различных электрических и биологических параметров, которые способствуют проведению электротрансформации клеток, находится адсорбция ДНК на поверхности клетки. Переменные электрические поля низкой интенсивности также способствуют переносу ДНК в бактерии вида *E. coli*, предположительно, за счет электрической стимуляции пермеаз ДНК. Получены доказательства доминирующего электродиффузионного или электрофоретического воздействия на генный трансфер посредством электропорации ДНК как полиэлектролита. Также сообщалось о электроосмотическом воздействии и впячивании мембраны, которому способствует электропорация.

Воздействие электрическим полем на мембрану дрожжевой клетки приводит к образованию временных пор, играющих решающую роль в процессе электропорации. Генератор электропорационного сигнала создает напряжение (в кВ), которое распространяется через зазор (в см) между электродами. Данная разность потенциалов определяет то, что называется напряженностью электрического поля, где E измеряется в кВ/см. Каждая клетка обладает своей собственной критической напряженностью поля для оптимальной электропорации. Это связано с размером клетки, строением мембраны и индивидуальными характеристиками самой клеточной стенки. Например, для клеток млекопитающих обычно требуется между 0,5 и 5,0 кВ/см до наступления клеточной смерти и/или электропорации. В целом, требуемая напряженность поля обратно пропорциональна размеру клетки.

EP 2257638 A1 относится к способам трансформации дрожжей с помощью электропорации. Они включают комбинацию ацетата лития (LiAc) и дитиотреита (ДТТ) в качестве кондиционирующих веществ, оба из которых применяются для повышения частоты трансформации дрожжевых клеток. Как показано в табл. 2, отсутствие предварительной обработки ДТТ или LiAc приводило к соответствующему снижению эффективности на 93,3% и 85,7%.

В равной степени, в работе Smith и соавт. (в статье: T Cell Receptor Engineering and Analysis Using the Yeast Display Platform. *Methods Mol Biol.* 2015; 1319:95-141) описано исследование в отношении ТКР при связывании с антигенами, такими как пептидные лиганды МНС (pепМНС). Существовала заинтересованность в конструировании аффинности ТКР, чтобы использовать этот класс молекул аналогичным образом, как это делается сейчас с антителами. Чтобы сконструировать ТКР и анализировать их связывающие свойства быстрее, в качестве плат формы использовали систему дрожжевого дисплея. Экспрессия и конструирование одноцепочечной формы ТКР, аналогично фрагментам scFv из антител, позволяют ТКР набирать аффинную зрелость с рядом возможных лигандов pепМНС. Кроме того, платформа на основе дрожжевого дисплея позволяет быстро получать варианты ТКР с различной аффинностью связывания и анализировать специфичность и аффинность без необходимости очистки растворимых форм ТКР. В статье описаны способы конструирования и анализа одноцепочечных ТКР при использовании дрожжевого дисплея.

Дрожжевые библиотеки не достигли размеров или эффективности, достигнутой библиотеками фагового дисплея, типичный максимальный размер фаговой библиотеки составляет 10^{10} - 10^{11} , тогда как типичная дрожжевая библиотека имеет размер 10^7 . Хотя недавний прогресс в разработке протоколов электропорации (см. Chao, *Nature Protocols* 1(2):755-768 (2006)) позволил достигнуть максимального размера дрожжевой библиотеки в 5×10^7 за одну трансформацию. До сих пор остается справедливым утверждение, что имеющиеся на данный момент размеры дрожжевых библиотек все еще значительно меньше того, что достижимо в обычных условиях для библиотек фагового дисплея размером 10^{10} - 10^{11} .

Способы и информация, изложенные выше, хотя и обеспечивают достижение все более высокой эффективности трансформации, остаются трудоемкими, требуя значительной затраты времени и повторных попыток объединения многочисленных малых библиотек размером 10^6 - 10^7 в более крупные и комбинированные библиотеки в диапазоне 10^8 - 10^9 .

Отбор на основе библиотеки дрожжевого дисплея с использованием для сортировки клеток как магнитных частиц, так активированной флуоресценции, предоставляет эффективный и чувствительный способ обогащения специфическими связывающими агентами к антигенам-мишеням, в частности за счет его совместимости с сортировкой клеток с активированной флуоресценцией (FACS). Однако преимущество данной стратегии отбора уменьшает ограниченный размер типичных библиотек дрожжевого дисплея вследствие низкой эффективности трансформации клеток дрожжей.

Таким образом, существует необходимость в эффективных способах получения библиотек белков, например библиотек ТКР при использовании дрожжей.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ получения электрокомпетентных дрожжевых клеток, включающий этапы: а) выращивания дрожжевых клеток до ОП₆₀₀ от около 1,0 до 2; б) промывки клеток холодной водой; в) промывки клеток холодным раствором, содержащим сорбит и CaCl₂; г) инкубирования клеток в растворе, включающем ацетат лития и трис(2-карбокситил)фосфин (ТСЕР); д) промывки клеток холодным раствором, содержащим сорбит и CaCl₂; е) ресуспендирования клеток в растворе, содержащем сорбит; и ж) факультативно, подходящего хранения указанных клеток.

В изобретении предложен, таким образом, высоко эффективный способ трансформации дрожжевых клеток, например для получения усовершенствованных библиотек дрожжевых клеток. Способы по изобретению устраняют существенные затруднения в применении технологии дрожжевого дисплея в качестве практического инструмента для доступа к намного большему разнообразию ТКР, которое не было исследовано ранее.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к способу трансфекции электрокомпетентных дрожжевых клеток, включающему этапы: а) обеспечения электрокомпетентными дрожжевыми клетками в соответствии со способом в соответствии с настоящим изобретением; б) промывки клеток холодным раствором, содержащим сорбит; в) смешивания клеток с ДНК, подвергающейся трансфекции, для получения пред-электропорационной смеси; г) переноса указанной пред-электропорационной смеси в подходящую кювету для проведения электропорации, и д) электропорации указанных клеток при значениях от около 2,5 до около 12,5 кВ/см в течение от около 2 до около 5 мс.

Предпочтительным является способ в соответствии с настоящим изобретением, в котором молекула указанной ДНК является линейной или кольцевой. Более предпочтительным является способ в соответствии с настоящим изобретением, в котором указанная ДНК включает библиотеку фрагментов ДНК, кодирующих библиотеку интересующих белков, например, в форме библиотеки поверхностного дисплея на основе дрожжей. Наиболее предпочтительным является способ в соответствии с настоящим изобретением, причем указанная библиотека дисплея является библиотекой Т-клеточных рецепторов (ТКР).

Неожиданно было обнаружено, что при использовании трис(2-карбоксиэтил)фосфина (ТСЕР) в качестве восстановителя эффективность трансформации по этому способу в соответствии с настоящим изобретением выше по сравнению с ДТТ, например, выше, чем 1×10^8 трансформантов дрожжей/мкг векторной ДНК, предпочтительно выше, чем 2×10^8 трансформантов дрожжей/мкг векторной ДНК.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к способу получения усовершенствованной дрожжевой библиотеки представляющих интерес белков, например, в виде библиотеки поверхностного дисплея на основе дрожжей, включающему этапы: а) обеспечения трансфицированными дрожжевыми клетками в соответствии с настоящим изобретением; б) разведения трансфицированных клеток раствором сорбита в питательной среде с получением смеси в соотношении 1:1; в) ресуспендирования клеток в подходящей питательной среде; г) факультативно, проведения разведений для подсчета разнообразия и посева указанных разведений на планшеты со средой SD-CAA, содержащей канамицин; и д) перенесения указанной библиотеки в подходящую питательную среду и расширение указанной библиотеки с помощью электропорации; и е) факультативно, надлежащего хранения расширенной библиотеки.

Предпочтительным является способ в соответствии с настоящим изобретением, в котором указанная библиотека дисплея является библиотекой Т-клеточных рецепторов. Предпочтительным является способ в соответствии с настоящим изобретением, в котором разнообразие указанной библиотеки выше, чем около 10^{12} .

В контексте настоящего изобретения понятие "вектор экспрессии" обозначает ДНК-конструкцию, которая включает точку начала автономной репликации (ARS), сайт инициации транскрипции и, по меньшей мере, один структурный ген, кодирующий белок, который экспрессируется организмом-хозяином. Сайт репликации, или точка начала репликации, - это любая последовательность ДНК, контролирующая репликацию векторов клонирования и экспрессии. Вектор экспрессии также, как правило, содержит надлежащие контрольные области, такие как один или несколько энхансеров и/или промоторов, супрессоров и/или сайленсеров, и терминаторов, которые контролируют экспрессию белка в дрожжевых клетках-хозяевах. Векторы экспрессии согласно настоящему изобретению могут также содержать маркер селекции, включающий необходимый ген, описанный в настоящем изобретении. Вектор экспрессии также факультативно содержит другие селективируемые маркеры, которые находятся в широком доступе и хорошо известны специалистам данной области. Векторы экспрессии - это один вид векторов. Векторы факультативно могут содержать одну или несколько последовательностей (элементов) ARS из одного или нескольких штаммов дрожжей.

Понятие "функционально связанный" означает, что сегменты ДНК организованы таким образом, что выполняют предписанную им функцию совместно, например, транскрипция инициируется в промоторе и проходит через кодирующий сегмент до терминатора.

Понятие "трансформация" или "трансфекция" означает введение ДНК или других нуклеиновых кислот в реципиентную дрожжевую клетку-хозяина, которая меняет генотип.

Понятие "трансформант" или "трансформированная клетка" означает реципиентную дрожжевую клетку-хозяина, которая подверглась трансформации, и ее потомство.

"Около" означает +/-10% заданного значения, если не указано иное.

Векторы, применимые в способах электропорации по изобретению, включают вектор pYD, любые другие векторы, и их производные конструкции, которые могут реплицироваться в дрожжевых клетках, или нуклеиновые кислоты в целом. Вектор экспрессии по настоящему изобретению может быть основан на векторе любого типа при условии, что этот вектор может трансформировать, трансфицировать или трансдуцировать дрожжевую клетку-хозяина. В предпочтительном варианте осуществления основой

вектора экспрессии является дрожжевая плаزمиды, в особенности из *S. cerevisiae*. После трансформации дрожжевых клеток экзогенная ДНК, кодирующая последовательности библиотеки, поглощается клетками и затем экспрессируется трансформированными клетками.

Более предпочтительно, вектор экспрессии может быть челночным вектором дрожжей и бактерий, который способен реплицироваться как в *E. coli*, так и в дрожжах (Struhl, et al. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci.). Включение последовательностей ДНК-плазмиды *E. coli*, такой как pBR322, способствует получению векторной ДНК в *E. coli* в достаточном количестве и, таким образом, эффективной трансформации дрожжей.

Виды дрожжевых плазмидных векторов, которые могут служить в качестве челноков, могут быть реплицирующим вектором или интегрирующим вектором. Реплицирующий вектор является дрожжевым вектором, способным опосредовать его собственную поддержку, вне зависимости от хромосомной ДНК дрожжей, посредством присутствия функциональной точки начала репликации ДНК. Интегрирующий вектор основан на рекомбинации с хромосомной ДНК в целях содействия репликации и, таким образом, дальнейшей поддержке рекомбинантной ДНК в клетке-хозяине. Реплицирующий вектор может быть на основе 2-микронной плазмиды, в которой точка начала репликации ДНК получена из 2-микронной плазмиды дрожжей. Альтернативно реплицирующий вектор может быть автономно реплицирующим (ARS) вектором, в котором "очевидная" точка начала репликации получена из хромосомной ДНК дрожжей. Факультативно, реплицирующий вектор может быть центромерной плазмидой (CEN), которая в дополнение к одной из указанных выше точек начала репликации ДНК имеет последовательность хромосомной ДНК дрожжей, несущей, как известно, центромеру.

Векторы могут быть трансформированы в клетки дрожжей в закрытой кольцевой форме или в линейной форме. Трансформация дрожжей с помощью интегрирующих векторов, хотя и характеризуется наследуемой стабильностью, может быть неэффективной, когда вектор имеет замкнутую кольцевую форму (например, с выходом лишь 1-10 трансформантов на мкг ДНК). Линеаризованные векторы со свободными концами, находящиеся в последовательностях ДНК, гомологичных хромосомной ДНК дрожжей, трансформируют дрожжи более эффективно (в 100-1000 раз), и трансформирующая ДНК обычно интегрируется в последовательности, которые гомологичны сайту расщепления. Таким образом, при расщеплении векторной ДНК с помощью подходящей экзонуклеазы рестрикции возможно увеличить эффективность трансформации и произвести нацеливание на хромосомный сайт интеграции. Интегративная трансформация можно применяться к генетической модификации пивных дрожжей при условии, что эффективность трансформации достаточно высока, и последовательность ДНК в качестве мишени для интеграции находится внутри области, которая не разрушает гены, необходимые для метаболизма клетки-хозяина.

Штаммы дрожжей, которые могут быть трансформированы с помощью способа электропорации согласно изобретению, включают виды из рода *Saccharomyces*, такие как *Saccharomyces cerevisiae* и рода *Schizosaccharomyces*, такие как *Schizosaccharomyces Pombe*. В одном варианте осуществления дрожжевые клетки являются диплоидными клетками дрожжей. Альтернативно дрожжевые клетки являются гаплоидными, таким как штамм "а"- и "α"-гаплоидных дрожжевых клеток.

"Библиотека Т-клеточных рецепторов" в контексте настоящего изобретения может включать подходящие части ТКР человека и/или ТКР человека с мутациями, подлежащие скринингу, предпочтительно, одноцепочечную форму ТКР, например, одноцепочечный в формате V_{β} -линкер- V_{α} (scТКР); или одноцепочечный в формате V_{α} -линкер- V_{β} , факультативно, слитый с саморасщепляющимся пептидом, например, 2А-пептидом. Также могут быть использованы опубликованные способы оптимизации экспрессии ТКР с минимальной модификацией аминокислотной последовательности дикого типа (например, Szymczak, A. L. et al. Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector. Nat Biotechnol 22, 589-594 (2004); Yang, S. et al. Development of optimal bicistronic lentiviral vectors facilitates high-level TCR gene expression and robust tumor cell recognition. Gene Ther 15, 1411-1423 (2008); Kuball, J. et al. Facilitating matched pairing and expression of TCR chains introduced into human T cells. Blood 109, 2331-2338 (2007); Cohen, C. J. et al. Enhanced Antitumor Activity of T Cells Engineered to Express T-Cell Receptors with a Second Disulfide Bond. Cancer Res 67, 3898-3903 (2007); Scholten, K. B. J. et al. Codon modification of T cell receptors allows enhanced functional expression in transgenic human T cells. Clin. Immunol. 119, 135-145(2006)).

Соотношение векторной ДНК к инсертированной ДНК находится в диапазоне от около 1:0,5 до около 1:10, например, 1:0,5, 1:1; 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 или 1:10. В одном варианте осуществления в реакции используют около 1 мкг векторной ДНК и около 1 мкг инсертированной ДНК. В другом варианте осуществления в реакции преципитации используют около 1 мкг векторной ДНК и около 2 мкг инсертированной ДНК. В другом варианте осуществления в реакции преципитации используют около 1 мкг векторной ДНК и около 3 мкг инсертированной ДНК. В еще одном варианте осуществления в реакции преципитации используют около 1 мкг векторной ДНК и около 4 мкг инсертированной ДНК. В еще одном другом варианте осуществления в реакции преципитации используют около 1 мкг векторной ДНК и около 5 мкг инсертированной ДНК.

В одном варианте осуществления клеточная суспензия включает от около 50 до около 400 мкл дрожжевых клеток, например, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 мкл дрожжевых клеток.

В одном варианте осуществления в суспензии дрожжевых клеток содержится от около 1 до около 10×10^9 дрожжевых клеток/мл, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10×10^9 дрожжевых клеток/мл.

В одном варианте осуществления напряженность поля, используемого для электропорации дрожжевых клеток, составляла около от 0,5 до около 12,5 кВ/см, например, 0,5, 1,0, около 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5 кВ/см.

В одном варианте осуществления дрожжевые клетки электропорировали при электрической емкости от около 10 до около 50 мкФ, например, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50.

В одном варианте осуществления дрожжевые клетки суспендировали при концентрации от около 0,1 до около 10 М сорбита и 0,1 до 10 мМ CaCl_2 или MgCl_2 , например, 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 или 10,0 М сорбита, или, например, 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 или 10,0 мМ CaCl_2 или MgCl_2 .

В одном варианте осуществления дрожжевые клетки инкубируют при концентрации от около 0,01 до около 1,0 М LiAc, например, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, около 0,7, 0,8, 0,9 или 1,0 М LiAc, и 1-100 мМ TCEP, например, 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, около 70, 80, 90 или 100 мМ TCEP.

В изобретении предложены способы для трансформации дрожжевых клеток, включающие электропорацию клеточной суспензии, содержащей дрожжи вместе с одной или несколькими нуклеиновыми кислотными конструкциями. Результатом трансформации дрожжевых клеток может стать любая форма от отдельного клона до популяции дрожжевых клеток (т.е., дрожжевая библиотека или библиотеки), которые могут использоваться для скрининга (а) пептида(ов) или белка(ов), представленных на поверхности дрожжевых клеток за счет связывания с поверхностным белком дрожжей или ассоциации посредством специфической ковалентной связи или нековалентного взаимодействия с белками поверхности дрожжевых клеток или другими компонентами; (б) пептида(ов) или белка(ов), экспрессируемых внутриклеточно; или (в) пептида(ов) или белка(ов), которые секретируются во внеклеточное пространство, такое как культуральная среда, или осаждаются на твердой поверхности. Такие дрожжевые библиотеки могут легко применяться для различных целей, для скрининга или определения характеристик взаимодействий между пептидом(ами) или белком(ами) с другим белком, пептидом, ДНК, РНК или другими химическими веществами, которые могут быть введены в дрожжевые клетки или добавлены экзогенно. Конкретными примерами являются те, что представлены дрожжевым дисплеем, дрожжевыми двойными гибридами, дрожжевыми тройными гибридами, и т.д.

В изобретении предложен способ трансформации дрожжевых клеток, включающий электропорацию клеточной суспензии, содержащей дрожжи вместе с одной или несколькими конструкциями нуклеиновой кислоты, включающими одну или более регулирующие последовательности и один или более генов или генных сегментов, при использовании одного или более из сопротивления, напряженности поля и длительности импульса, достаточных для трансформации дрожжевых клеток.

В одном варианте осуществления напряженность поля составляет от около 2,5 до около 12,5 кВ/см. В конкретных вариантах осуществления напряженность поля составляет 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 или 2,5 кВ/см. Данные показатели учитывают, что кювета для электропорации имеет зазор 0,2 см. Возможны более высокие показатели напряженности поля, но их практическое применение зависит во многом от разработки прибора, который может генерировать более сильные импульсы.

В одном варианте осуществления длительность импульсов составляет от около 3 до около 10 миллисекунд. В конкретном варианте осуществления длительность импульсов составляет около 4 миллисекунд.

Воздействие на клетки способами электропорации по изобретению производится с приложением электрического поля к суспензии дрожжевых клеток между двумя электродами. Напряженность поля должна быть с оправданной точностью скорректирована, так чтобы электропорация клеток проходила без повреждений, или же при минимальных повреждениях клеток. Расстояние между электродами может быть измерено и на электроды подано подходящее напряжение в соответствии с формулой $E=V/d$ (E =напряженность электрического поля в В/см; V =напряжение в вольтах; и d =расстояние в см).

Генераторы импульсов для проведения процедур, описываемых в настоящем изобретении, доступны и были доступны на рынке в течение многих лет. Один из подходящих генераторов сигнала - Gene Pulser II (Bio-Rad Laboratories, Inc., Геркулес, Калифорния, США). Обычная схема представлена прибором Gene Pulser II, соединенным с дополнительной емкостью и контроллером импульсов плюс модули.

В рамках настоящего изобретения электропорацию используют для облегчения введения ДНК в дрожжевые клетки. Электропорация - это процесс использования импульсного электрического поля для временной пермеабиллизации клеточных мембран, что позволяет макромолекулам, таким как ДНК, проникнуть в клетки. Тем не менее, реальный механизм, по которому ДНК переносится в клетки, еще не достаточно хорошо понят. Электропорация неожиданно эффективна для трансформации, к примеру, *Candida famata*, когда на клетки воздействуют экспериментально затухающим импульсным электрическим полем с напряженностью поля от около 10 до около 13 кВ/см и величиной сопротивления около R5

(129 Ом), и с константой времени, составляющей около 4,5 мс. Обычно сопротивление и емкость либо установлены, либо могут быть выбраны пользователем в зависимости от выбранного оборудования для электропорации. В любом случае настройку оборудования проводят в соответствии с инструкциями производителя для обеспечения надлежащих напряженности поля и параметров затухания.

В изобретении далее предложены высокоэффективные способы трансформации дрожжей, которые позволяют достичь высокий уровень экспрессии любого из или нескольких желаемых эндогенных (т.е., существующих в природе в такой дрожжевой клетке) или гетерологичных генов. Способы согласно изобретению далее относятся к способу получения библиотек, например, таких, которые экспрессируют ТКР, scТКР, химеры или их фрагменты.

Согласно одному сценарию векторы экспрессии, несущие интересующие гены, могут быть трансформированы в дрожжевые клетки-хозяева посредством электропорации, чтобы получить отдельный клон или библиотеку множества трансформированных клеток, экспрессирующих внутриклеточные белки (например, ядерные или цитоплазматические белки), мембранные белки (например, белки, пронизывающие мембрану или прикрепленные к мембране белки), или же секретируемые белки. Специалист будет в состоянии использовать трансформированные клетки или библиотеку для очистки белков, изучения функций белков, идентификации белок-белковых взаимодействий или идентифицировать новые связывающие агенты или партнеров по взаимодействию белков. Важно отметить способность создавать крупные библиотеки на основе дрожжей, способные презентировать или экспрессировать ТКР и фрагменты ТКР. Эта библиотека может подвергаться селекции антигенами-мишенями в целях идентификации ТКР, которые связываются с селектирующими антигенами.

Поскольку трансформированные дрожжи имеют тенденцию терять искусственно сконструированные плазмиды, полезно использовать культуральную среду, чтобы оказывать на них давление положительного отбора. Если штамм является ауксотрофным мутантом в отношении существенного метаболита, и когда используемая векторная плаزمидка включает маркерный ген, способный сохранять прототрофность штамма, например, ген LEU2, данное давление отбора может быть оказано за счет устранения метаболита из культуральной среды. Существуют другие средства получения того же результата, которые также могут использоваться для практического осуществления данного изобретения.

В зависимости от природы интересующего структурного гена продукт или продукт экспрессии может оставаться в цитоплазме дрожжевой клетки-хозяина или секретироваться. Было обнаружено, что растворимым являются не только белки, остающиеся в клетке, но и те, что секретированы. В тех случаях, когда продукт или продукт экспрессии должен оставаться в дрожжевой клетке-хозяине, в целом может быть желательным, чтобы в наличии имелась индуцируемая область инициации транскрипции, так чтобы до достижения трансформантом высокой плотности, экспрессия или генерация желаемого продукта была на низком уровне или отсутствовала. После достаточного времени для экспрессии продукта или продукта экспрессии клетки можно выделять обычными способами, например, с помощью центрифугирования, лизиса, и выделить интересующий продукт. В зависимости от природы и применения продукта лизат может подвергаться различным способам очистки, таким как хроматография, электрофорез, экстрагирование растворителя, кристаллизация, диализ, ультрафильтрация или тому подобным. Хроматографические способы включают, но без ограничения, газовую хроматографию, ВЭЖХ, колоночную хроматографию, ионообменную хроматографию и другие способы хроматографии, известные специалистам данной области. Степень чистоты может варьироваться от около 50 до 90% или выше, предпочтительно, вплоть до около 100%.

Альтернативно продукт экспрессии или интересующий продукт может секретироваться в культуральную среду и производиться на непрерывной основе, если среду частично удаляют, экстрагируют желаемый продукт, например, с помощью колоночной или аффинной хроматографии, ультрафильтрации, преципитации или подобных способов, и использованную среду удаляют или производят ее рециркуляцию восстановлением необходимых компонентов. Пермеат, содержащий продукт после ультрафильтрации, может дополнительно подвергаться концентрированию, дополнительно с помощью выпаривания, с последующей кристаллизацией или преципитацией с помощью спирта и/или регулирования уровня pH. Специалистам данной области известны многие варианты обработки. Если необходимо вызвать секрецию продукта, то обычно для этого задействован конститутивный сайт инициации транскрипции, хотя могут использоваться и неконститутивные участки.

Другие предпочтительные варианты осуществления могут быть понятны из примеров со ссылками на чертежи согласно настоящему описанию, тем не менее, не ограничиваясь ими. В соответствии с целями изобретения все цитируемые источники включены в данное описание во всей полноте путем ссылки.

На чертеже представлено сравнение улучшенной эффективности трансфекции TCER в сравнении с ДТТ в одинаковых условиях.

Примеры

В практическом осуществлении изобретения используются, если не указано иное, обычные методики электропорации клеток и клеточной биологии дрожжей, которые хорошо известны в данной области техники.

I. Среды.

1. Среда YPD:

дрожжевой экстракт 10 г;

бактопептон 20 г;

декстроза 20 г;

довести объем до 1 л, добавив H₂O (добавить стерильный раствор глюкозы в автоклавированный раствор).

2. SD-CAA (рН 4,5):

дигидрат цитрата натрия 14,8 г (конечная концентрация 50 мМ);

моногидрат лимонной кислоты 4,2 г (конечная концентрация 20 мМ);

в 800 мл H₂O, автоклавировать;

казаминовые кислоты 5,0 г;

основа азотного агара для дрожжей (без аминокислот) 6,7 г;

глюкоза 20 г;

довести объем до 1 л, добавив H₂O, и провести стерильную фильтрацию.

3. Чашки с SD-CAA:

сорбит 182,2 г;

агар 15 г;

цитрат натрия 14,8 г;

моногидрат лимонной кислоты 4,2 г;

в 800 мл H₂O, автоклавировать и охладить до ~55°C;

казаминовые кислоты 5,0 г;

основа азотного агара для дрожжей (без аминокислот) 6,7 г;

глюкоза 20 г;

сульфат канамицина 35 мг;

в 200 мл H₂O и провести стерильную фильтрацию, добавить в охлажденный раствор после автоклавирования.

II. Подготовка электрокомпетентных дрожжевых клеток.

Производят высев штрихами 20 мкл свежеразмороженного штамма из коллекции Yeast stock, хранившегося при -80°C, на чашки с агаром YPD и инкубируют в течение двух дней при 30°C. Отдельные колонии (собрать колонию целиком) собирают из чашек с агаром YPD в 15 мл среды YPD и производят встряхивание в течение ночи при 30°C. На следующее утро 10 мл культуры переносят на 100 мл свежей среды YPD и продолжают встряхивание в течение 7 ч при 30°C. Определяют ОП₆₀₀ и 1 л холодной среды YPD засевают до ОП₆₀₀ 0,2. Колбу для встряхивания помещают в предварительно охлажденный (4°C) встряхиватель. Встряхиватель запрограммирован на включение подогрева (30°C) и встряхивания (250 об./мин) за 5 ч до начала рабочего дня. Инкубирование проводится до достижения ОП₆₀₀ в 1,5, что достигалось обычно через 6 ч после начала встряхивания.

Последующие этапы проводят на льду при использовании охлажденных растворов, пробирок, кювет и центрифуги, если не указано иное.

Клетки осаждают при 2000 g и 4°C в течение 3 мин (2-этапный процесс в 10 пробирках Falcon, 50 мл), дважды промывают в 25 мл холодной H₂O и осаждают центрифугированием при 2000 g в течение 3 мин. Клетки промывают в 25 мл холодного раствора сорбита, 1 М/ CaCl₂, 1 мМ; и осаждают центрифугированием при 2000 g в течение 3 мин. Клетки ресуспендируют в 25 мл раствора ацетата лития, 100 мМ/ТСЕР, 10 мМ. Пробирки Falcon 50 мл с фильтровальной крышкой используют для аэрации; клетки инкубируют при 30°C со встряхиванием при 160 об./мин в течение 30 мин, помещают на лед и клетки осаждают центрифугированием при 2,000 g и 4°C в течение 3 мин. Клетки промывают 25 мл холодного раствора 1 М сорбита/1 мМ CaCl₂; и осаждают центрифугированием при 2000 g и 4°C в течение 3 мин, и промывают в 25 мл раствора 1 М холодного сорбита; и осаждают центрифугированием при 2000 g и 4°C в течение 3 мин. Клетки ресуспендируют в конической пробирке в холодном 1 М растворе сорбита до конечного объема 400 мкл на одну процедуру электропорации. Электрокомпетентные клетки можно хранить непосредственно при -80°C. До использования образцов для электропорации просочившиеся соли необходимо удалить центрифугированием (2000 г, 4°C, 5 мин) и дважды промыть холодным раствором сорбита, 1 М.

III. Электропорация.

400 мкл клеток смешивают с 5-10 мкл ДНК (векторной) в H₂O, выдерживают на льду в течение 3 мин и переносят в предварительно охлажденную кювету для электропорации с зазором 0,2 см. С помощью системы для электропорации BioRad MicroPulser клетки электропорированы при 2,5 кВ. Типичные константы времени составляли около 4 мс, предпочтительно, 4 мс. Электропорированные клетки переносят в 10 мл смеси в пропорции 1:1 сорбита 1 М: среда YPD при 30°C на 1 ч без встряхивания. Клетки собирают с помощью центрифугирования при 2000 г в течение 3 мин при комнатной температуре и ресуспендируют в 10 мл SD-CAA при комнатной температуре. Были сделаны разведения для подсчета разноразмерности (от 1:10⁵ до 1:10⁷). Разведения в планшетах со средой SD-CAA, содержащей канамицин, инкубируют в течение 1 дня при 30°C и в течение трех дней при комнатной температуре. Библиотеку перено-

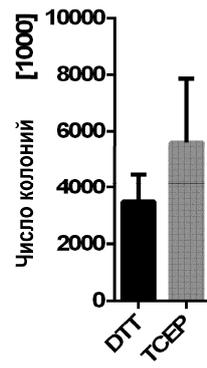
сят в 100 мл среды SD-CAA (предпочтительно, на процедуру электропорации) и продолжают встряхивать в течение 24 ч при 30°C при 160 об./мин. Размноженные библиотеки можно использовать непосредственно для индукции или хранить при 4°C в течение двух недель. Долгосрочное хранение можно производить с помощью замораживания в 30% глицерине при -80°C.

При использовании наиболее оптимального условия электропорации в обычных условиях можно достичь эффективности трансформации дрожжевых клеток, составляющей около 2×10^8 дрожжевых трансформантов/мкг векторной ДНК (см. чертеж). Поскольку данная эффективность трансформации достигнута в минимальном объеме клеток (100 мкл), она очень легко поддается автоматизации и осуществлению на устройствах для электропорации в многолуночных планшетах.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения электрокомпетентных дрожжевых клеток, включающий этапы:
 - а) выращивание дрожжевых клеток до $ОП_{600}$ между 1.0 и 2;
 - б) промывка клеток холодной водой;
 - в) промывка клеток холодным раствором, содержащим сорбит и $CaCl_2$;
 - г) инкубирование клеток в растворе, содержащем ацетат лития и трис-(2-карбоксиил)фосфин (ТСЕР);
 - д) промывка клеток холодным раствором, содержащим сорбит и $CaCl_2$;
 - е) ресуспендирование клеток в растворе, содержащем сорбит.
2. Способ по п.1, дополнительно включающий этап подходящего хранения указанных клеток.
3. Электрокомпетентные дрожжевые клетки, полученные способом по п.1 или 2, обладающие повышенной эффективностью трансфекции.
4. Способ трансфекции электрокомпетентных дрожжевых клеток, включающий этапы:
 - а) обеспечения электрокомпетентными дрожжевыми клетками, полученными в соответствии с п.1 или 2, или электрокомпетентными дрожжевыми клетками в соответствии с п.3;
 - б) промывки клеток холодным раствором, содержащим сорбит;
 - в) смешивания клеток с ДНК, подвергающейся трансфекции, для получения пред-электропорационной смеси;
 - г) переноса указанной пред-электропорационной смеси в подходящую кювету для электропорации, и д) электропорации указанных клеток при значениях от 2.5 до 12.5 кВ/см в течение между 2 и 5 мс.
5. Способ в соответствии с п.4, причем указанная ДНК является линейной или кольцевой.
6. Способ в соответствии с п.4 или 5, причем указанная ДНК содержит библиотеку фрагментов ДНК, кодирующих библиотеку интересующих белков, например, в форме библиотеки поверхностного дисплея на основе дрожжей.
7. Способ в соответствии с п.6, причем указанная библиотека дисплея является библиотекой Т-клеточных рецепторов (ТКР).
8. Способ получения улучшенной дрожжевой библиотеки интересующих белков, включающий этапы:
 - а) обеспечения трансфицированными дрожжевыми клетками в соответствии со способом в соответствии с любым из пп.4-7;
 - б) разведения трансфицированных клеток раствором сорбита в питательной среде с получением смеси в соотношении 1:1;
 - в) ресуспендирования клеток в подходящей питательной среде; и
 - г) переноса указанной библиотеки в подходящую питательную среду и расширения указанной библиотеки путем электропорации.
9. Способ по п.8, дополнительно включающий этап проведения разведений для подсчета разнообразия, и посева указанных разведений на планшеты с SD-CAA, содержащей канамицин.
10. Способ в соответствии с п.8 или 9, причем дрожжевая библиотека интересующих белков находится в форме библиотеки поверхностного дисплея на основе дрожжей.
11. Способ по любому из пп.8-10, дополнительно включающий этап подходящего хранения указанной расширенной библиотеки.
12. Способ по любому из пп.8-11, причем указанная библиотека дисплея является библиотекой Т-клеточных рецепторов.
13. Способ в соответствии с любым из пп.8-12, причем разнообразие указанной библиотеки выше чем 10^{12} .

043912



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2
